Illustre Prof. Pio Foà
Omaggio rispettoso

Istituto anatomico di Napoli

SULLA

Evoluzione degli eritroblasti

5
240

RICERCHE DEL

Prof. Giuseppe Boccardi

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno LVI. — N. I.

NAPOLI
TIP. ED. TOCCO & SALVIETTI
S. PIETRO A MAIELLA, 34.
1902.

Istituto anatomico di Napoli

SULLA

Evoluzione degli eritroblasti

RICERCHE DEL

Prof. Giuseppe Boccardi

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno LVI. — N. I.

NAPOLI
TIP. ED. TOCCO & SALVIETTI
S. PIETRO A MAIELLA, 34.
1902.

Segnalo in questa nota alcune osservazioni che ho potuto fare studiando la midolla ossea in parecchi animali (cavia, coniglio, topo, cane, tacchino).

Le mie ricerche sono state praticate in parte sopra preparati *a stampo* della midolla ossea essiccati rapidamente all'aria o nella stufa a 37° e poi fissati trattandoli per 5-10' con un miscuglio a parti eguali di alcool assoluto e cloroformio (1).

---

(1) Si sa bene che la parola *fissazione* ha in questo caso significato e valore relativi, trattandosi di elementi già fissati essenzialmente dal disseccamento; sicchè il trattamento ulteriore è destinato a certi scopi speciali, p. es. a rendere insolubile l'emoglobina. Dalle ricerche fondamentali di Ehrlich questo punto è stato stabilito assai nettamente, sebbene ciò sembri trascurato da quelli che si occupano di studiare nuovi fissatori pel sangue già disseccato. La miglior pruova di questo fatto emerge da ciò che i suddetti fissatori fanno poi assai mediocre pruova sul sangue fresco o peggio ancora sopra un cilindretto di m.dolla ossea fresca, un pezzetto di milza ecc. Le più fini particolarità di alcuni elementi (p. es. la comparsa di granulazioni neutro-anfofile nel citoplasma granulare basofilo di alcuni mielociti) facilmente distinguibili sopra i preparati per disseccamento sfumano o quasi su' preparati ottenuti con tali fissatori.

Restano assolutamente, migliori pel momento il miscuglio di Foà (bicromato, solfato sodico e sublimato) il liquido di Acquisto, la soluzione di formalina in alcool assoluto, l'acido picrico e sublimato; ma tutti lasciano qualche cosa a desiderare. Dominici parla di un suo speciale miscuglio al sublimato, jodo e joduro di *K* (non credo sia pubblicata la formola integrale) che, a quanto sembra, si deve ridurre ad una soluzione di bijoduro di mercurio.

Ho trovato utile in taluni casi come fissatore della midolla ossea fresca

Ho praticato più ordinariamente la colorazione successiva con eosina AB (soluzione acquosa 1 °/₀) e poi con turchino di metilene in soluzione acquosa allungata. Come controllo ho usata talvolta la colorazione col triacido di Ehrlich e più spesso con emallume, eosina ed orange.

E qui credo indispensabile un'osservazione.

Generalmente i colori basici di anilina e toluidina si comportano come coloranti nucleari e v'ha autori che preferiscono chiamarli correntemente colori nucleari (*Bolles-Lee*) senza accettare in modo assoluto la distinzione fondamentale dei colori in basici ed acidi qual' è stata stabilita principalmente dall' Ehrlich. Io debbo richiamare l' attenzione sul fatto che, specialmente per la midolla ossea, non v'è equivalenza fra colore *nucleare* e colore *basico*. Infatti i mielociti giovani con orlo citoplasmatico liscio basofilo e, fino ad un certo punto, anche quelli con citoplasma più abbondante, granuloso e basofilo, presentano un nucleo voluminoso che si colora assai debolmente col turchino di metilene, mentre con l' emallume o, in generale, con le tinture a base di emateina, si colorano abbastanza nettamente, sebbene non mai in grado notevole.

La stessa osservazione in grado minore può farsi su' linfociti. Questi, trattati col turchino di metilene, presentano talvolta maggiore basofilia nel citoplasma che nel nucleo, come giustamente ha fatto osservare Ehrlich. Trattati invece con ematossilina, il loro nucleo si colora assai intensamente, mentre il citoplasma rimane incolore.

Questo fatto, che sarà stato osservato da quanti hanno studiato tali elementi coi due metodi suindicati ha per me un'importanza non lieve.

Se vogliamo ammettere che l'emateina colora più specialmente

---

il liquido di v. Gehuchten così modificato: alcool assoluto 60, cloroformio purissimo 40, acido acetico 1; ma non ne sono contento per tutti i rispetti. Mi sembra dunque di poter affermare che un buon fissatore per gli elementi emo-linfatici nel senso rigoroso della tecnica moderna non si possegga e che le fissazioni più usate abbiano un valore provvisorio.

Nel nostro laboratorio ho fatto usare il miscuglio di cloroformio ed alcool assoluto da due anni nei preparati ben disseccati e me ne trovo assai bene. Se si ha cura di eseguire tale trattamento sulle lastrine in un recipiente che chiuda bene, bastano poche gocce dei due reagenti.

Il semplice cloroformio è stato proposto recentemente anche da altri per lo stesso scopo.

la *cromatina* nucleare, dobbiamo ammettere poi che questa è generalmente basofila; ma che la basofilia del nucleo non è legata esclusivamente alla cromatina ch' esso possiede; poi che la cromatina può essere, se non abbondante, discreta, mentre la basofilia è minima. Alcuno potrebbe immaginare una variabile basofilia della cromatina, restando costante la sua affinità per l'emateina. Anche potrebbe ammettersi a fianco alla cromatina un'altra sostanza associata ad essa in proporzioni variabili ed effettivamente basofila. Io non mi sento in grado per ora di risolvere questo problema, che richiede studî speciali e profondi. Ho dovuto, però, insistere su questo fatto, perchè nel corso di queste osservazioni ho notato sovente il mancante parallelismo fra la colorazione emateinica e la basofilia nucleare.

Ho rivolta la mia attenzione specialmente sugli eritroblasti, dei quali ho seguito lo sviluppo dal momento in cui sono appena differenziati, sino alla completa evoluzione, che precede immediatamente la formazione degli eritrociti.

Parlo, ben inteso, di animali adulti e quindi lascio da parte lo studio della midolla fetale, che, per le sue particolarità, merita una trattazione separata.

Gli eritroblasti molto giovani si presentano come elementi di forma poligonale irregolare per la compressione degli elementi vicini, se *in situ*: isolati mostrano talvolta una forma ovoidale. Le dimensioni di essi sono molto diverse *anche nella midolla di animali adulti*, poichè io ho trovato più frequenti quelli il cui diametro oscilla tra 8-9 μ; ma ho trovato un discreto numero di elementi che raggiungono 11-14 μ. Non sono poi tanto rare le forme più piccole, cioè di 5-6 μ.

Ehrlich ammette nella midolla ossea degli animali adulti solo normoblasti, ritenendo i megaloblasti come proprii della midolla fetale o di alcuni stati patologici. Però altri, come Schaumann, Askanazy ecc. non credono possibile una separazione precisa tra le forme normoblastiche e quelle megaloblastiche, ammettendo che nella midolla ossea si possono trovare forme di transizione fra questi due tipi.

Per le mie osservazioni io debbo associarmi a questa seconda opinione. Infatti, nei preparati che ho l' onore di presentare alla Accademia, si osservano le più diverse dimensioni e, in uno di essi, si possono osservare, l'uno a fianco dell'altro due eritroblasti, l'uno dei quali misura poco più di 8 μ e l'altro 15. Non ho trovato mai

elementi che raggiungessero 18-20 μ, da potersi considerare come veri gigantoblasti; ma è facile concludere che nella m. ossea se prevalgono i normoblasti, esistono anche elementi che si possono chiamare megaloblasti o almeno forme di transizione, non che pochi microblasti.

Non per questo, però, io posso ammettere assolutamente la opinione di Askanazy, il quale ritiene che i megaloblasti diano origine sempre a' normoblasti. Ciò è vero forse durante i primi tempi della vita estrauterina o durante il primo anno di vita. Io ho notato però nell'adulto che le forme megaloblastiche possono compiere la rispettiva evoluzione nel modo che ora descriverò, e quindi non posso ritenere che sempre da' megaloblasti derivino i normoblasti e da questi gli eritrociti. Se da una parte è vero che i megaloblasti si fanno sempre più rari nella vita estrauterina, non posso negare ch'essi siano capaci di trasformarsi direttamente in eritrociti. Chiunque abbia osservato moltissimi preparati di sangue avrà notato la presenza di alcuni elementi realmente più grandi degli altri (9-10 μ) anche nel sangue normale. Questi veri macrociti, che pure possono riscontrarsi nel sangue d'individui sani, derivano, secondo ogni probabilità, dall'evoluzione di qualcuna delle suddette forme intermedie. Per la stessa ragione non posso accettare l'opinione che nega recisamente il possibile reperto di corpuscoli più piccoli della norma; perchè questi, sebbene rarissimi, possono derivare da' microblasti esistenti nella midolla ossea.

In questo primo periodo il citoplasma è più o meno abbondante e basofilo, assumendo col turchino di metilene una tinta piuttosto scura, non egualmente intensa per tutta la massa; senza che però si possa parlare in alcun modo di granulazioni o di aspetto reticolare.

È possibile, a prima giunta, confondere gli eritroblasti in questa fase di sviluppo con altri elementi; ma la distinzione é facile e sicura.

I mielociti se ne distinguono perchè il nucleo di essi si colora assai debolmente col turchino di metilene; mentre il nucleo degli eritroblasti si colora intensamente e già da questo momento assume quella tinta zaffirina ben nota che è in certo modo caratteristica di esso quasi costantemente.

Il nucleo dei mielociti presenta qualche zolla più intensamente colorabile ma sempre in grado leggiero. Il nucleo degli eritroblasti

presenta anch'esso qualche punto più fortemente colorato del resto e quasi brillante per la forte colorazione.

Colorando con emallume o ematossilina la differenza dei nuclei è meno saliente ma pur sempre facile, perchè, se il nucleo dei mielociti si colora discretamente, quello degli eritroblasti si colora energicamente ed in modo quasi omogeneo. Nei mielociti molto giovani l'orlo protoplasmatico omogeneo si colora splendidamente in turchino schietto coll'azzurro di metilene, in quelli più adulti compaiono le finissime granulazioni basofili del citoplasma; mentre il discoplasma degli eritroblasti non si colora mai in turchino così schietto ed è sempre un po' più scuro.

Appena un po' più difficile è la distinzione da' linfociti mezzani e grandi, il cui nucleo si colora più intensamente di quello dei mielociti tanto con l'ematossilina che col turchino di metilene; non mai però in modo da eguagliare quello degli eritroblasti. Il turchino di metilene dà poi a questo quel tale aspetto zaffirino che non si riscontra mai nel nucleo dei linfociti. Inoltre il citoplasma linfocitico si colora in turchino assai più schietto e presenta una struttura granulosa o reticolare come vuole Ehrlich.

Finalmente la confusione è possibile con alcune forme di *mastzellen* il cui nucleo si colora piuttosto fortemente ed è circondato da un alone citoplasmatico basofilo scuro; ma appunto per questo il nucleo di tali elementi risalta assai poco nella massa che l'involge e quindi non v'è da ingannarsi.

Noto qui di passaggio che nei preparati ben fatti, cioè praticando delicatamente l'impressione della midolla ossea sul vetrino e fissando bene in seguito, il corpo degli eritroblasti non si presenta mai sfrangiato o dentellato come accade talvolta negli eritroblasti più adulti che per avventura si possono riscontrare nel sangue di anemici, leucemici ecc.

Progredendo l'evoluzione dei globuli rossi nucleati, si notano alcuni fatti importanti che concernono più specialmente il nucleo. Questo sembra un po' più voluminoso di prima, si colora appena un po' meno fortemente con l'emallume, ma sensibilmente meno col turchino di metilene, come si può comprovare facilmente se si ha cura di non protrarre a lungo la colorazione con questa sostanza. Questa norma poi è assolutamente necessaria, se si vogliono studiare le altre particolarità minute.

Risulta quindi che a questo punto la basofilia del nucleo diminuisce sensibilmente e che la cromatina subisce una certa rarefa-

zione; ma questo secondo fatto è meno notevole del primo. Due o tre volte ho potuto riscontrare nel citoplasma piccoli cumoli di una sostanza fortemente basofila che sembra distaccarsi dal nucleo; ma non posso insistere su questo punto che mi riserbo di studiare ancora.

Contemporaneamente si riscontra un importante reperto più agevole a dimostrare nei preparati colorati con eosina e turchino di metilene (sempre avendo cura di non eccedere con quest'ultimo). Nella massa nucleare, ma più distintamente verso la periferia di essa sorgono piccole granulazioni che si colorano assai distintamente con l' eosina e con altri colori acidi, sì che debbono risultare di una sostanza ossifila.

Queste granulazioni sono assai diverse ne' vari eritroblasti per grandezza e disposizione. Talvolta sono appena eguali alle granulazioni acidofile β o neutroanfofile ε che sorgono nel citoplasma de' mielociti (o anche degli elementi propriamente detti mononucleari da Ehrlich) quando incomincia la trasformazione di essi in elementi a nucleo polimorfo. Tal altra si riuniscono in modo da formare una specie d' incompleto reticolo nella massa nucleare. Altre volte, ciò che sembra indicare uno sviluppo più avanzato, sono sensibilmente più grandi, quanto le granulazioni *alpha* e si trovano alla periferia del nucleo, immediatamente presso al discoplasma. Anche, in alcuni casi, confluiscono in zolle maggiori e allora il nucleo, pel contrasto fra la colorazione azzurra o verde-azzurra della cromatina e la colorazione rossa di tali masse presenta uno speciale aspetto screziato.

Durante questo periodo il citoplasma è dapprima ancora schiettamente basofilo, sempre, però, assumendo col turchino di metilene la tinta fosca speciale. Nessun indizio riscontrasi all' inizio di tali fatti, di *policromatofilia* nel discoplasma, cioè di quella tinta mista, violacea, che indica una modificazione chimica nella sostanza di esso, ossia la presenza di emoglobina in piccola quantità diffusa nel protoplasma. Ma questa tinta non tarda a manifestarsi: i globuli nucleati presentano allora quell'aspetto loro proprio, pel quale vengono indicati e descritti generalmente quali eritrociti giovani. Intanto nel nucleo si riscontrano ancora le suddette granulazioni o masse ossifile.

È assolutamente necessario in questo caso colorare piuttosto debolmente col turchino i preparati, chè altrimenti i granuli ossifili non appaiono o solo difficilmente nella massa nucleare, salvo che la colorazione con l'eosina non sia stata proprio intensissima.

Non è molto raro il constatare che le zolle ossifile passano dalla periferia del nucleo nel discoplasma; però è difficile dimostrare il passaggio dei granuli più piccoli. Ordinariamente sono zolle maggiori che si riscontrano nella parte del discoplasma più prossima al nucleo. È questa una costatazione che debbo lealmente fare e che spiega il mio riserbo nelle conclusioni.

Più tardi, l'aspetto degli eritroblasti si modifica considerevolmente. Il nucleo subisce una specie di condensazione, per la quale diventa non solo più piccolo che nel periodo antecedente, ma spesso più piccolo che nelle forme più giovani quali le ho descritte in principio. I granuli ossifili sono rarissimi o mancano affatto; però potrebbe darsi ch'essi non fossero più distinguibili nella massa nucleare più densa, fortemente basofila. A questo momento il nucleo comincia a presentare ben distinto quell'aspetto caratteristico che appariva in certo modo fin da principio e che vien considerato come una *picnosi* del nucleo stesso. Il discoplasma assume sempre più sensibilmente la tinta acida e quindi appare di un rosso-mattone appena sfumato di viola.

Più tardi ancora, l' evoluzione dell' eritroblasto è compiuta. Il discoplasma è di un rosso-mattone vivace, il nucleo fortemente colorabile co' colori basici e con l'ematossilina. Nessuna traccia più di granulazioni ossifile. È l' aspetto che presentano i corpuscoli rossi nucleati quando compaiono nel sangue per condizioni abnormi e solo eccezionalmente in un caso di leucemia mielogena ho visto qualche eritroblasto che ancora presentava rari granuli ossifili nel nucleo.

Sorge ora la questione ancora dibattuta sul meccanismo dell'ulteriore trasformazione degli eritroblasti in eritrociti.

È noto come due opposte dottrine si contendono il campo: l'una che ammette l'espulsione del nucleo dal globulo ed è sostenuta da Rindfleisch e da' suoi seguaci ; l' altra, propugnata da Neumann e Kölliker che ritiene come un fatto artificiale l'espulsione del nucleo ed ammette la scomparsa di questo per dissoluzione progressiva.

Ehrlich ha tentato conciliare le due dottrine , in quanto egli ammette che la prima maniera di trasformazione sia propria dei normoblasti , mentre la seconda si verificherebbe solo nei megaloblasti.

Prima di accennare alle mie modeste osservazioni su questo proposito, debbo occuparmi per un momento dei fenomeni di scissione negli eritroblasti.

Non essendomi occupato in questo studio che della midolla in condizioni fisiologiche e quindi non in condizioni di attività esagerata, io non ho constatato che la sola scissione diretta. Questa è tutt'altro che rara e può riscontrarsi in tutti i periodi dell' evoluzione globulare; però mi è sembrato ch'essa sia rarissima durante il periodo nel quale il nucleo presenta molti granuli ossifili. L' ho trovata frequente nel primo periodo da me descritto, come pure ne' nuclei quando cessa quello stato che potrebbesi chiamare di attività funzionale. É noto ch'essa si riscontra non raramente anche nei globuli nucleati circolanti nel sangue in casi di anemia intensa, di leucemia e specialmente di anemia pseudo-leucemica infantile. Questo fatto è importante perchè dimostrerebbe che il ciclo di attività germinale nel nucleo può conservarsi per molto tempo.

Meno frequente che nei normoblasti è la scissione diretta nei megaloblasti. Anche qui si sa che in casi di anemia splenica si possono trovare nel sangue megaloblasti in via di scissione, ovvero con più nuclei. Se nella midolla di animale adulto dalla scissione dei megaloblasti derivino altri megaloblasti o, invece, normoblasti non è facile decidere per l' esiguo numero delle osservazioni. Nel sangue circolante sembra più probabile che i megaloblasti con più nuclei restino tali, senza che la scissione si assolva.

Per quanto riguarda, ora, la scomparsa del nucleo, ecco ciò che io ho potuto osservare. L'anno decorso presentai all'Accademia preparati ne' quali si scorgevano megacariociti nella cui massa protoplasmatica si riscontravano nuclei di eritroblasti (più propriamente di normoblasti). Feci notare come questo fatto deponesse in favore della teoria di Rindfleisch, poichè quei nuclei non potevano essere usciti artificialmente dai globuli, nè era presumibile che i fagociti avessero, in certo modo, *digerito* il discoplasma lasciando intatto il nucleo.

Debbo aggiungere ora che *anche* l'altro modo di scomparsa del nucleo mi appare dimostrato da numerose osservazioni di progressiva involuzione del nucleo che si riduce ad un cumulo sempre più piccolo. Ho osservato globuli il cui nucleo era ridotto alla dimensione di 1.5 μ, pur conservando la caratteristica basofilia e l'aspetto zaffirino della sua massa.

In queste condizioni il nucleo rassomiglia ad una grossa granulazione eosinofila avendone la forma vescicolare (però essendo basofilo!). Anche questo fatto mi conferma nell'opinione che la baso-

filia del nucleo non sia in rapporto diretto ed assoluto con la quantità di cromatina.

Non posso però accordarmi con Ehrlich in ciò che io ho riscontrato tale involuzione nucleare in forme tipiche di normoblasti perfino nel sangue circolante. Essa, dunque, non è propria dei megaloblasti.

Ora v'è da domandarsi quale sia la natura della sostanza ossifila che compare nel nucleo durante un certo periodo dell' evoluzione degli eritroblasti.

Io ho lasciato intravedere il mio concetto che quella sostanza possa essere emoglobina, la quale sarebbe quindi un prodotto di attività secretrice del nucleo e da questo passerebbe nel citoplasma. Tale opinione io accenno con tutto il riserbo dovuto alle difficoltà di un indagine chimica rigorosa e che io non mi dissimulo per nulla.

La facilità con cui tale sostanza assume i colori acidi dimostra che non si tratta della sostanza acromatica nucleare; mentre la disposizione d'essa ordinariamente sotto forma di granuli esclude che possa trattarsi di *enchilema nucleare*. È importante anche il fatto che la detta sostanza compare nel nucleo quando il citoplasma non mostra ancora la policromatofilia indice d' incipiente accumulo d'emoglobina in essa. Anche le poche osservazioni che ho potuto fare sul passaggio diretto di tale sostanza dal nucleo nel citoplasma mi confortano in tale opinione.

Posso aggiungere qui altre osservazioni in appoggio di questa interpetrazione. Nei globuli nucleati del tritone, previo il trattamento da me seguito per la midolla ossea dei mammiferi, ho riscontrato più volte in nuclei la cui cromatina era diradata e la basofilia diminuita gli stessi granuli ossifili, spesso riuniti in masse più considerevoli. Anche su' globuli di tacchino ho potuto ripetere tale osservazione, tanto nel sangue circolante quanto sulla midolla ossea

Si può dunque supporre che nei globuli nucleati permanentemente la produzione di emoglobina sia possibile in ogni momento, mentre nei globuli dei mammiferi essa sarebbe circoscritta ad un dato periodo evolutivo degli eritroblasti. Io credo, però, più opportuno constatare i fatti osservati, mantenendo un certo riserbo sulla interpretazione di essi.

Chè, se molti fatti depongono in favore di questa ipotesi, non si hanno ancora tutte quelle prove rigorose che accorrono a fondare una dottrina.

Io ho voluto controllare i fatti osservati col metodo anzidetto

trattando la midolla ossea col liquido di Flemming, poi distendendone uno straterello su' vetrini spalmati d'albume-glicerina secondo un processo che descrissi sin dal 1888 e poi colorando col metodo di Galeotti lievemente modificato.

Lo stesso processo ho adottato pe' globuli di pollo e di tacchino, ove ho applicato egualmente il metodo da me seguito quattordici anni addietro, colorando però secondo Galeotti (1).

I risultati sono già molto incoraggianti, poi che ho potuto colorare splendidamente con la fucsina acida i granuli suddetti e constatarne talvolta il passaggio nel citoplasma.

Il riserbo ch'io m'impongo, adunque, è figlio di un rigorismo scientifico che mi sembra doveroso in argomento così importante.

Che il nucleo possa produrre l'emoglobina non può parere arrischiato oggi che la partecipazione del nucleo ad alcuni processi secretivi è rigorosamente dimostrata.

L'Accademia ha udito in altra occasione la comunicazione del del Prof. Petrone, il quale ritiene sicuro che un composto ferruginoso, che secondo lui non fa parte forse dell'emoglobina, è il prodotto di un corpicciuolo da lui descritto e variamente interpretato in lavori successivi. È lo stesso corpicciuolo accuratamente studiato da Maximow come nucleo accessorio e del quale nel laboratorio di Golgi fu già dimostrato che coesiste col nucleo degli eritroblasti.

Ognun vede la profonda differenza tra le mie osservazioni e le scoperte del Prof. Petrone per le quali è giusto che a lui spetti tutto il merito e tutta la responsabilità.

Io quindi non istarò a discutere le sue vedute. Noterò soltanto francamente che egli ha proposto col suo formio-carminio un buon metodo di colorazione pel corpicciuolo suddetto. In pari tempo, però, debbo manifestare il più assoluto riserbo circa la reazione con cui egli ha inteso recentemente suffragare le sue dottrine. Le ricerche compiute dal mio allievo sig. Orsi su tale proposito non mi consentono per nulla d'accettare l'interpretazione dell'egregio Collega fondata sopra un errore di metodo.

---

(1) Ho usato la fucsina acida in soluzione nell'acqua fenicata al 5 °/o come si usa per la fucsina basica pel liquido di Ziehl.